

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia doktori program

*Wolbachia pipientis* baktériumok szimbiózisa gerinctelenekkel:  
Mikrobiális molekuláris taxonómiai vizsgálatok

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

Nyíró Gábor

Doktori Iskola Vezetője:  
Erdei Anna  
DSc., egyetemi tanár,  
MTA lev. tagja

Doktori Program Vezetője  
Dózsa-Farkas Klára  
DSc., egyetemi tanár

Témavezető  
Márialigeti Károly  
Tanszékvezető  
egyetemi docens

Készült az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén



2009

## BEVEZETÉS

Ha éjszaka arra riadunk fel, hogy egy szúnyog köröz a fejünk körül, hamar megpróbálunk a kispárnával pontot tenni a zaklatás végére. A hófehér plafonon maradó méretes vérfoltot dühödten próbáljuk ledörzsölni, de aztán nyugodtan hajtjuk ismét álomra a fejünket, hiszen a másnapi viselkedésre bevált gyógyír a nagyitól tanult ecetes bedörzsölés. Valljuk be őszintén, kit érdekel háromnegyed kettőkor, hogy hány tagú és milyen diverzitású is az ökológiai rendszer, amiből kenetet képeztünk a falon.

Sajnos, egy hasonló találkozás a világ más tájain, más undok vérszívókkal, már sokkal komolyabb következményekkel járhat, hiszen az egyedfejlődésükhöz, szaporodásukhoz vért igénylő ízeltlábúak számos emberi betegség kórokozóját hordozzák és adják át táplálkozásuk során. Ezek a kórokozók lehetnek vírusok, baktériumok, egysejtűek, vagy akár többsejtű paraziták fertőző formái is, amelyek milliókat betegítenek meg világszerte, komoly egészségügyi és világgazdasági problémákat okozva.

A mikrobiológiai, parazitológiai és orvosi entomológiai kutatásokat egyaránt forradalmasította egyes molekuláris biológiai módszerek, mint a PCR, a klónozás vagy a DNS bázissorrend elemzés felhasználása. Ezekkel az eljárásokkal lehetővé vált az ízeltlábú vektorok által továbbított betegségek kórokozóinak részletes, genetikai, genomikai szintű megismerése, ami által célzott módszerekkel próbálhatjuk meg kordában tartani ezeket a kórokozókat és vérszomjas hordozóikat.

A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása adott lehetőséget arra is, hogy egy régóta ismert, de sejtes endoszimbionta életmódja miatt a klasszikus mikrobiológiai módszerekkel megközelíthetetlen baktérium faj, a *Wolbachia pipientis* részletes biológiáját és genetikáját megismerjük. Ez a bakteriális endoszimbionta megtalálható az ízeltlábúakban, többek között a vérszívó, betegségterjesztő fajokban is, és az állati valamint az emberi filáriázist okozó fonálférgekben is előfordul. Biológiájának és genetikájának a részletes ismerete lehetőséget nyújt arra, hogy a vérszívó ízeltlábúak és az általuk terjesztett betegségek leküzdésében sajtós tulajdonságai miatt a segítségünkre legyen.

Tekintsük át, miben különleges ez a baktérium és miért érdemes a kutatásával foglalkozni!

## CÉLKITŰZÉSEK

Az ELTE-TTK Mikrobiológiai Tanszékén a kezdetek óta folynak vizsgálatok az állat-mikróba kölcsönhatások, bakteriális szimbiózisok témakörben. Az eddigi kutatások feltárták egyes talajlakó gerinctelenek bélbaktériumainak diverzitását valamint a köztük fennálló táplálkozási szimbiózis bizonyos vonatkozásait. Klasszikus mikrobiológiai, tenyésztési módszerekkel Márialigeti és munkatársai kezdték el a vizsgálatot, majd Oravecz és munkatársai DNS alapú, molekuláris taxonómia módszereket vezettek be a prokarióta bélmikrobióta vizsgálatára. Ezekkel a molekuláris biológiai módszerekkel lehetővé vált a nem tenyésztendő bakteriális szimbionták vizsgálata is.

Így lett doktori munkám és dolgozatom fő célja a *Wolbachia* szimbiózisok megismerése és vizsgálata. A *Wolbachia* baktériumok klasszikus tenyésztési mikrobiológiai módszerekkel nem vizsgálhatók, hiszen a baktérium partner obligát endocitobionta szervezet, így kutatásainkban molekuláris mikrobiológiai, molekuláris taxonómiai módszereket használtunk fel a szimbionták jellemzésére.

A *Wolbachia* szimbiózisok a ízeltlábúakban főként a gazdaszervezetek szaporodását befolyásolják. Ezért a szexuális szimbiotikus kapcsolatok közelebbi megismerése lehetőséget nyújt arra, hogy megismerjük miképpen hat a baktérium partner a gazdák szaporodására, ivararányára és ezeken keresztül azok elterjedésére és abundanciájára. Az így eltanult trükköket felhasználhatjuk a kártevő és betegségokozó ízeltlábúak ellen, biológiai védekezési módszerek kifejlesztésére.

Az ízeltlábúakban található *Wolbachia* baktériumokat szexuális vagy szaporodási parazitának tekintjük, míg a fonálférgekben élő *Wolbachia*-k mutualista szimbiózist alkotnak gazdáikkal.

Vizsgálataink fő célja *Wolbachia pipientis* szimbionták kimutatása és jellemzése molekuláris taxonómia módszerekkel. Az elvégzett vizsgálatokat a gazdaszervezetek és a szimbiotikus kölcsönhatások típusai szerint is két csoportba oszthatjuk:

1. *Wolbachia* szaporodási parazitákat kerestünk a lomberdeink talajlakó gerinctelen makrofaunájának gyakori fajaiban (Isopoda, Diplopoda). Ezek körében ismert jelenség a parthenogenezis, ezért megvizsgáltuk, hogy állhat-e *Wolbachia* fertőzés ezen jelenségek mögött.

2. A mutualista szimbionta *Wolbachia*t egy olyan, filáriázist okozó nematoda faj esetében vizsgáltuk, ami kutyák szemférgességét okozza. Ezt a megbetegedést a közelmúltban először Észak-Amerikában ismerték fel, azóta hazai és más európai esetek is előkerültek. A fő kérdés az volt, döntsük el, hogy ezt az újonnan megjelent betegséget egy új nematoda faj okozza vagy egy ismert faj jelent meg új gazdaszervezeten, új területen. Vizsgálatainkban molekuláris taxonómiai módszerekkel jellemeztük a nematoda *Wolbachia* baktériumot és a mutualista szimbionta partnerek koevolúcióját kihasználva elősegítettük a megbetegedést okozó nematoda pontos leírását.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A *Wolbachia pipientis* baktériumok obligát, intracelluláris szimbionták az ízeltlábúaknak és a nematodáknak. Ez azt jelenti, hogy nem lehet őket a gazdaszervezeten kívül, egyszerű mikrobiológiai táptalajokon növesztetni, fenntartani. *Wolbachia* törzsek fenntartására és vizsgálatára két lehetőség mutatkozik. Az egyik az élő állatban, gazdatenyészetben való fenntartás, amit például a *Drosophila* fajok esetében alkalmaznak (Bourtzis és mtsai, 1996). A másik lehetőség pedig az eukarióta, gazda eredetű szövettenyészetben való fenntartás (O'Neill és mtsai, 1997). Ezek egyrészt időigényes, másrészt nagyon költséges módszerek doktori munkám kezdetén nem voltak megvalósíthatók a Mikrobiológiai Tanszéken.

A *Wolbachia* szimbionták vizsgálatához egy gyors és egyértelmű választ adó vizsgálati módszert, a kiválasztott marker gének specifikus PCR termékeinek direkt szekvenálását választottuk (O'Connor és mtsai, 1991, O'Neill és mtsai, 1992, Zhou és mtsai, 1998).

Ennek a módszernek az előnyei a következők:

- Viszonylag gyors és egyszerűen kivitelezhető diagnosztikai módszer
- Egyszerre több minta vizsgálható, több szempontból különböző oligonukleotid primerek felhasználásával
- A DNS szekvencia egyértelmű azonosítást tesz lehetővé és filogenetikai vizsgálatokra is felhasználható valamint hosszútávon is összehasonlítható eredményeket ad

### ***Wolbachia* szimbionták vizsgálata ízeltlábúakban**

Gyakori hazai Isopoda és Diplopoda fajokat gyűjtöttünk, ezeket a taxonok specialistáival meghatározottuk. 96%-os alkoholban egyesével tárolt mintákat folyékony nitrogén fagyasztás után dörzsmozsárban eldörzsöltük és a mintából teljes genomi DNS-t izoláltunk

Rainey és munkatársai által 1996-ban közölt módszerrel. A tisztított DNS-t PCR reakcióba vittük és felszaporítottuk a bakteriális 16S rRNS gén egy szakaszát, ami az univerzális 63F, 1387R primerek közé esik. A *Wolbachia* kimutatáshoz a terméket nested-PCR reakcióba vittük *Wolbachia* specifikus primerekkel (76F, 1012R). A *Wolbachia* specifikus PCR terméket direkt szekvenáltuk Sanger-féle láncterminációs módszerrel. A kapott DNS szekvenciák alapján elvégeztük a *Wolbachia* szimbionta partnerek filogenetikai elemzését.

### ***Wolbachia* szimbionták vizsgálata Nematódákban**

A szemférgességgel diagnosztizált kutyákból műtéti úton eltávolítottuk a csomókat, fertőzött szövetdarabokat és egész férgeket. A minták feléből elektronmikroszkópos és fénymikroszkópos vizsgálatokhoz előkészített preparátumokat készítettünk. A minták másik feléből folyékony nitrogén fagyasztás és eldörzsölés után teljes genomi DNS-t izoláltunk Rainey és munkatársai által 1996-ban közölt módszerrel. A tisztított DNS-t PCR reakcióba vittük és felszaporítottuk a Nematóda mitokondriális COI génjének egy szakaszát, majd direkt szekvenáltuk Sanger-módszerrel. A kapott szekvenciákat összehasonlítottuk más rokon *Onchocerca* fajok hasonló génjeivel. Filogenetikai vizsgálatot végeztünk a Nematóda *Wolbachia* szimbiontáján is. A bakteriális 16S rRNS gén egy szakaszát amplifikáltuk, ami az univerzális 63F, 1387R primerek közé esik, majd a *Wolbachia* kimutatáshoz a terméket nested-PCR reakcióba vittük *Wolbachia* specifikus primerekkel (76F, 1012R). PCR termékeket készítettünk a *Wolbachia* szimbionta *ftsZ* és *wsp* génjeiről is. Ezeket a PCR terméket direkt szekvenáltuk Sanger-féle láncterminációs módszerrel. A kapott DNS szekvenciák alapján elvégeztük a *Wolbachia* szimbionta partnerek filogenetikai elemzését.

## **EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK**

### **A vizsgálati módszerek értékelése**

A *Wolbachia* baktériumok nem tenyésztethők klasszikus mikrobiológiai, agarlemez alapú, módszerekkel, kimutatásukra a molekuláris mikrobiológiai faj azonosítási technikák felhasználása adott megoldást.

Vizsgálatainkban a különböző típusokba (szexuális parazita /mutualista) és csoportokba tartozó *Wolbachia pipientis* szimbiontákat DNS alapú eljárással, molekuláris mikrobiológiai diagnosztikai PCR-rel mutattuk ki és a kapott PCR termékek direkt szekvenálásával azonosítottuk. Az így kapott DNS szekvenciákat filogenetikai analízisnek vetettük alá és

megállapítottuk a szimbionták rokonsági viszonyait. A szimbionta baktériumok jelenlétét elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is kimutattuk a gazdaszervezetek szöveteiből. A szimbionta látható jelenléte megerősíti a DNS alapú eredményeket, tekintve, hogy kimutatták, hogy a *Wolbachia* genom nagy fragmentumai beépülhetnek a gazdaszervezet kromoszómáiba.

### **A *Wolbachia* vizsgálatok eredményei az ízeltlábúakban**

45 ászka egyedet vizsgáltunk meg *Wolbachia* fertőzés szempontjából, ezek 8 fajhoz tartoztak és 2 távoli mintavételi területen gyűjtöttük őket. A minták nagy részéből, 60-100% prevalenciával sikerült kimutatni a fertőzést. Az irodalmi adatoknak megfelelően egyes mintából előkerültek olyan, B-főcsoportba tartozó *Wolbachia* törzsek, amelyek a már leírt ászka *Wolbachia* szimbionta szekvenciákkal egy csoportot alkotnak. Mintáink nagy részéből azonban egy új típusú szimbiontát sikerült kimutatni. Ezek a szekvenciák filogenetikailag a *Wolbachia* A-főcsoportjába kerülnek, mint a *Drosophila melanogaster* vagy a *Muscidifurax uniraptor* szimbiontái. Ez a filogenetikai elkülönülés részben megfeleltethető a minták földrajzi helyzetének, mert a dunaszigeti mintavételi helyen gyűjtött egyedek szimbiontái kizárólag az A-főcsoportba esnek. A tatabányai mintavételi területen A- és B-főcsoportba tartozó szimbiontákat is találtunk egyazon élőhelyen. A *Trachelipus ratzeburgii* faj esetében a két élőhelyen különböző szimbiontát találtunk (Dunasziget: A-főcsoport, Tatabánya: B-főcsoport).

### ***Wolbachia* vizsgálatok eredményei a Nematodákban**

Kutyák szemférgességét okozó vitatott besorolású nematoda faj esetében az előzőekben tárgyalt - az ászkák esetében már sikeresen használt - diagnosztikai PCR-t használtuk a *Wolbachia* szimbionta partnerek kimutatására. A 16S rRNS gén, 852 bp hosszú részleges szekvenciáit összehasonlítottuk más filáriázist okozó nematodák szimbiontaival. Ez alapján az *Onchocerca lupi* nematoda szimbiontája a *Wolbachia* C-főcsoportba került, viszont elkülönül a többi ismert *Onchocerca* szimbiontától. A szimbionták riboszómális RNS-t kódoló szekvenciái alapján konstruált fa topológiája nem egyezik a nematodák morfológiai alapon rekonstruált leszármazásával, ennek oka az, hogy a 16S rRNS szerkezetét megszabó funkcionális kényszerek miatt, ennek a génnek az evolúciója lassú, így nem biztos, hogy alkalmas a *Wolbachia* törzsek evolúciójának finom léptékű feloldásához.

A pontosabb, nagyobb felbontású filogenetikai analízishez további marker géneket vontunk be a vizsgálatba. Ezek a gyors evolúciójú *wsp* (*Wolbachia surface protein*) gén, ami egy sejtfelszíni fehérjét kódol valamint az *ftsZ* gén, ami a bakteriális sejtosztódásban játszik

kulcsszerepet. Más szerzők gyakran használják a fenti marker géneket a *Wolbachia* törzsek elkülönítésére.

### Legfontosabb eredményeink

1. *Wolbachia*-specifikus, a 16S rRNS gént célzó, nested PCR alapú kimutatási eljárást dolgoztunk ki és ezt sikerrel hasznosítottuk ízeltlábú és nematoda *Wolbachia* szimbionták kimutatására.
2. 8 gyakori hazai ászkafaj fertőzöttségét mutattuk ki. Ezek közül 4 fajt (*Protracheoniscus politus*, *Hyloniscus riparius*, *Trachelipus rathkii* és *Trachelipus ratzeburgii*) először vizsgáltunk *Wolbachia* fertőzés szempontjából.
3. Az eddigi vizsgálatok az ászkák körében csak a *Wolbachia* B-főcsoportba tartozó szimbiontákát találtuk. Vizsgálatainkból kiderült, hogy Magyarországon, a vizsgált területeken az ászka fajok nagy része eddig nem ismert *Wolbachia* A-főcsoportba tartozó baktériumokat hordoz.
4. A *Trachelipus ratzeburgii* faj esetében a két mintavételi helyen különböző főcsoportba tartozó *Wolbachia* szimbionta partnereket találtunk. Dunaszigeten a faj általunk vizsgált egyedei az A-főcsoportba tartozó szimbiontát hordoztak, míg Tatabányán B-főcsoportba tartozót. A tatabányai mintavételi területen megvizsgált fajok esetében, szimpatrikusan, A- és B-főcsoportba tartozó szimbiontákát is találtunk. Ezzel szemben az összes, Dunaszigetről származó ászka esetében csak az A-főcsoportba tartozó szimbiontát sikerült kimutatni.
5. Az érzékeny, PCR-alapú diagnosztikai módszerrel 60-100%-os, meglepően magas prevalenciájú fertőzést találtunk az ászkáknál.
6. A megvizsgált Diplopoda fajok között nem sikerült *Wolbachia* fertőzést kimutatni, a nagy érzékenységű PCR módszer felhasználásával sem. Ez a negatív eredmény, bár kevés fajon és egyeden alapul megegyezik Bouchon eredményeivel. Így elmondhatjuk, hogy az ezerlábúak körében tapasztalt parthenogenezis feltehetően nem *Wolbachia* szimbionta eredetű.
7. A kutyák szemférgességét okozó, morfológiai adatok alapján különálló fajnak *Onchocerca lupi* fonálféreg *Wolbachia* szimbiontáját is megvizsgáltuk az általunk kifejlesztett 16S rRNS gén PCR módszerrel. A *Wolbachia* szimbionták jelenlétét kimutattuk elektronmikroszkópos vizsgálattal és DNS alapú diagnosztikai PCR-rel is.

8. A 16S rRNS gén szekvenciák filogenetikai analízise alapján a szimbiontát a *Wolbachia* C-főcsoportba soroltuk. A kapott DNS szekvencia nem egyezett egyetlen korábban leírt *Onchocerca* szimbiontáéval sem. A nematoda és a *Wolbachia* szimbionták filogenetikai helyzetét további marker gének vizsgálatával próbáltuk felderíteni, ezért felszaporítottuk és szekvenáltuk a nematoda mitokondriális *COI* génjét, valamint a szimbionta *ftsZ* és *wsp* génjeit. A filogenetikai összehasonlítás mindhárom marker gén esetében azt mutatta, hogy az *O. lupi* és *Wolbachia* szimbiontája külön áll a többi *Onchocerca* fajtól és szimbiontáiktól. A gazda nematoda és a *Wolbachia* baktérium hasonló leszármazási mintázata azt mutatja, hogy ez a két faj régóta stabil közös koevolúciós kapcsolatban áll.
9. A kutyák szemférgességét okozó *O. lupi* és *Wolbachia* endoszimbiontája experimentális modellként felhasználva lehetőséget nyújt az emberi filáriázisos megbetegedések részletesebb laboratóriumi vizsgálatára.
10. A szemféreggel fertőzött kutyák kezelésére a férgek és az általuk létrehozott csomók műtéti eltávolítását javasoljuk. Postoperative a kutyákat a makro- és mikrofiláriák ellen hatékony szerekkel is szokás kezelni. Bizonyos antibiotikumok közvetten, a *Wolbachia* endoszimbionta baktériumok kiirtása által elpusztítják a mikrofiláriákat és sterilizálják a kifejlett nőstényeket, ezért azonnali elnyújtott hatású oxitetraciklin injekciót javasolunk, ez a kezelés csökkenti a férgesség kiújulásának valószínűségét, valamint az ízeltlábú vektorok által történő terjesztést.



## A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

### A dolgozatban tárgyalt referált tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Nyíró G., Oravecz O., Márialigeti K. (2002): Detection of *Wolbachia pipientis* infection in arthropods in Hungary, **European Journal of Soil Biology**. February 2002; 38(1):63-66

Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Nyíró G., Dobos-Kovács M., Márialigeti K., Varga I. (2002): Electron microscopic and molecular identification of *Wolbachia* endosymbionts from *Onchocerca lupi*: implications for therapy, **Veterinary Parasitology**. 30 May 2002; 103(1):75-82

Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Nyíró G., Márialigeti K., Varga I. (2002): Molecular phylogenetic analysis of *Onchocerca lupi* and its *Wolbachia* endosymbiont, **Veterinary Parasitology**. 10 September 2002; 108(2):153-161

### Egyéb szerzői joggal védett mű

Klasson L., Nyíró G., Lutnaes Y., Naslund K., Eriksson AS., Veneti Z., Chen L, Garrett R., Bourtzis K. and Andersson S.G.E. (2005): Genome sequence variability of *Wolbachia* strains wRi and wMel that includes cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. Manuscript. in **Lisa Klasson: Genome Evolution in Maternally Inherited Insects Endosymbionts** Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 75. p.117-156, *Acta Universitatis Uppsala 2005*, ISBN 91-554-6299-5

### A dolgozatban tárgyalt konferencia kiadványok, konferencia összefoglalások

Nyíró G., Klasson L., Lutnaes Y., Naslund K., Eriksson AS., Andersson S. (2005): Comparative genomics of different strains of *Wolbachia pipientis* bacteria, **1st Central European Forum For Microbiology (CEFORM), Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology**, Hotel Helikon, Keszthely, Hungary, October 26-28, 2005., Editor: Zs. Bános, Editor in chief: I. Nász, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, Vol.52 Suppl.1, p.114

Nyíró G., Oravecz O., Márialigeti K. (2002): Detection of *Wolbachia pipientis* infection in arthropods in Hungary, **Biodiversity of Soil Organisms and Ecosystem Functioning**, Editor: Josef Rusek, Elsevier Paris 2002., ISBN 2-84299-385-3, p.199-203

**Third International Wolbachia Conference**, Heron Island, Queensland, Australia, 21-26 August 2004

Nyíró G., Klasson L., Lutnaes Y., Naslund K., Eriksson AS., Chen L, Bourtzis K., Andersson S. (2004):, Developments of the WUNI genome project. *Előadás*  
Klasson L., Nyíró G., Lutnaes Y., Naslund K., Eriksson AS., Chen L, Bourtzis K., Garrett R., Andersson S. (2004): The Genome Sequence of *Wolbachia* Strain WRI. *Előadás*

**Second International Wolbachia Conference**, OAC, Kolymbari, Crete, Greece, 9-15 July 2002., Nyíró G., Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Varga I., Márialigeti K. (2002): Characterisation of the *Wolbachia* endosymbiont of *Onchocerca lupi* infecting dogs. *Poszter*